

(54) DETECTION OF AIMED NUCLEIC ACID IN SPECIMEN

(11) 1-252300 (A) (43) 6.10.1989 (19) JP  
(21) Appl. No. 63-231737 (22) 16.9.1988 (33) JP (31) 87p.328785 (32) 25.12.1987  
(71) WAKUNAGA PHARMACEUT CO LTD (72) AKIO YAMANE(2)  
(51) Int. Cl. C12Q1/68, G01N33/50

**PURPOSE:** To make possible to readily detect in high sensitivity, by subjecting a primer complimentary to a nucleic acid sequence to be detected to an elongation reaction, fixing the nucleic acid sequence of resultant elongated substance and detecting.

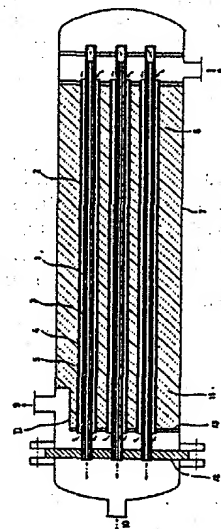
**CONSTITUTION:** At least one primer complimentary to a nucleic acid sequence to be detected is used. The primer complimentary to the nucleic acid sequence is subjected to elongation reaction and the resultant nucleic acid sequence, or other nucleic acid sequence part having two-chains formed with individual elongated primer substances are detected after fixed to a solid phase carrier.

(54) HYDROGEN OCCLUSION ALLOY REACTOR

(11) 1-252501 (A) (43) 9.10.1989 (19) JP  
(21) Appl. No. 63-81839 (22) 1.4.1988  
(71) AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL(1) (72) HIROSHI SUZUKI(7)  
(51) Int. Cl. C01B3/00//F28D20/00

**PURPOSE:** To raise heat exchange rate and reaction rate, by equipping a means to introduce a hydrogen gas into hollow parts of molded articles and to discharge the gas and a means to feed a heating (refrigeration) medium to voids between heat transfer pipes and conduits and to release the heating (refrigeration) medium.

**CONSTITUTION:** Molded articles 1 of hydrogen occlusion alloy which have hollow parts 2 and heat transfer pipes 3 are stuck fast to the outer periphery of the molded articles 1 and cover the molded articles. Conduits 5 surround the outer periphery of the heat transfer pipes 3 in parallel while making small gaps 4 between the pipes and the conduits and these conduits are piled to form a thermal reactor 6 and the reactor is horizontally supported in parallel in a closed container 7. The container 7 is provided with an inlet 8 to feed a heating (refrigeration) medium and an outlet 9 and the heating (refrigeration) medium is rapidly circulated through narrow sections of the voids 4. The container 7 is also equipped with a hydrogen gas inlet 10 to introduce and release a hydrogen gas and the gas is circulated through the hollow parts 2 in the molded articles. Consequently, flow velocity of the medium is increased, the voids 4 can be narrowly designed and made with ease and total amount of the medium retaining in the reactor can be lessened.



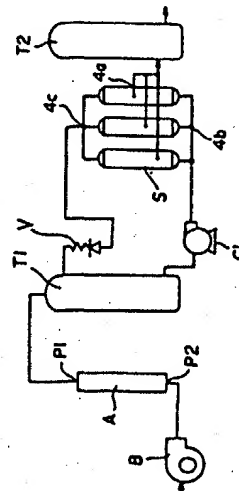
11: heat insulating material

(54) PRODUCTION OF HIGH-PURITY OXYGEN GAS

(11) 1-252502 (A) (43) 9.10.1989 (19) JP  
(21) Appl. No. 63-78136 (22) 1.4.1988  
(71) HAKKO SEISAKUSHO K.K.(1) (72) SUETAKA ERIGUCHI(1)  
(51) Int. Cl. C01B13/02, B01D53/04, B01D53/22

**PURPOSE:** To obtain a high-purity oxygen gas, by removing nitrogen and argon from an oxygen gas containing nitrogen and argon prepared by separating nitrogen from air by utilizing difference in relative gas transmission rate of a thin film provided with gas transmitting and separating ability.

**CONSTITUTION:** Air sent from a blower B to an adsorption column A is separated into a  $N_2$  gas of a readily adsorbable component and a mixed gas of  $O_2$  and Ar of a slightly adsorbable component. The former is released to the atmosphere by another piping line and the latter is concentrated and accumulated through a port P1 in a tank T1. The mixed gas of  $O_2$  and Ar containing a very small amount of  $N_2$  accumulated in the tank T1 by adsorption method is pressurized by a compressor C1 and sent to a transmission device S under pressure. An  $O_2$  gas is permeated through hollow yarns, sent to an outlet 4a and an Ar gas can not be transmitted through the hollow yarns completely, passed in the hollow yarns and sent to an outlet 4c. The  $O_2$  gas from the outlet 4a is accumulated in a tank T2, the mixed gas from the outlet 4c is returned through a pressure adjusting device V, returned to the tank T1 and resent through the compressor C1 to the transmission device S.



## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-252300

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成1年(1989)10月6日

C 12 Q 1/68

A-6807-4B

G 01 N 33/50

P-7055-2G

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全14頁)

⑥ 発明の名称 検体中の目的核酸の検出法

② 特 願 昭63-231737

② 出 願 昭63(1988)9月16日

優先権主張 ③ 昭62(1987)12月25日 ③ 日本(JP) ④ 特願 昭62-328785

⑦ 発 明 者 山 根 明 男 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研究所内

⑦ 発 明 者 中 上 智 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研究所内

⑦ 発 明 者 三 好 健 一 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研究所内

⑦ 出 願 人 湧永製薬株式会社 大阪府大阪市福島区福島3丁目1番39号

⑦ 代 理 人 弁理士 佐藤 一雄 外2名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

検体中の目的核酸の検出法

## 2. 特許請求の範囲

1. 下記の工程(イ)～(フ)を実施することを特徴とする、検体中の少なくとも一つの目的核酸の検出法(ただし、工程(ハ)～(ヌ)は、該目的核酸が存在するものとして実施するものとする)。

(イ) 少なくとも一つの目的核酸(以下、核酸(I)という)存在の有無を検知しようとする検体を用意すること。

(ロ) 核酸(I)と相補的で、該核酸よりは短い該核酸と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さの一本鎖核酸(以下、核酸(II)という)を用意すること。

(ハ) 該検体中において、核酸(I)を、これが一本鎖のものであればそのまま、これが二

本鎖のものであれば一本鎖にしてからその少なくとも一方について、核酸(II)とハイブリダイズさせ、この核酸(II)をプライマーとしてそこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて、生成合成核酸鎖と核酸(I)との二本鎖核酸を形成させること。

(ニ) 必要に応じて、該検体中において、上記二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させること。

(ホ) 必要に応じて、核酸(I)が二本鎖のものであったときに各鎖について工程(ロ)、

(ハ) および(ニ)を実施して得られる二種の核酸鎖を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせること。

(ヘ) 必要に応じて、工程(イ)～(ハ)または(イ)～(ホ)を実施して得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にした後、その少なくとも一方について、核酸(II)とハイブリ

ダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(Ⅰ)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(Ⅰ)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。

(ト) 必要に応じて、該検体中において、上記二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させること。

(チ) 必要に応じて、(ヘ)を実施した後、最終的に得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にして、その少くとも一方について、核酸(Ⅱ)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(Ⅰ)の各鎖

について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(Ⅰ)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させることから成る工程を、1回行うかまたは複数回にわたって順次段階的に繰り返して行なうこと。

(リ) 必要に応じて、該検体中において、上記二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させること。

(ヌ) 工程(ハ)、(ホ)、(ヘ)および(チ)の産物である二本鎖核酸、工程(ニ)、(ト)および(リ)の産物である一本鎖核酸に、下記のいずれかの手段によって、固体担体と結合しうる部位からなる官能基と検出可能な標識からなる官能基とを持たせること。

(イ) 両官能基の一方をまたは双方を個々に持つプライマーまたは官能基を持たないプライマーの使用および両官能基の一方をまた

### — 3 —

は双方を個々に持つ単位核酸または官能基を持たない単位核酸の使用によって、該合成核酸鎖を両官能基を持つものとして得る。

(ii) 該合成核酸鎖を一方の官能基を持つものとして形成させ、その後、そこへ、該検体中において、他方の官能基を導入する。

(ル) 工程(ヌ)の産物である両官能基を持つ核酸鎖を、該固体担体と結合しうる部位からなる官能基を利用して、該検体中において、固体担体と結合させること。

(ヲ) 工程(ル)より得られる固体担体を洗浄して、固体担体に結合していない核酸を除去すること。

(ワ) 工程(ヲ)より得られる固体担体を、該標識からなる官能基を利用する検出操作に付して、固体担体に結合している核酸の有無を、検出すべき核酸に対応するものとして検知すること。

### — 4 —

## 3. 発明の詳細な説明

[発明の背景]

### 技術分野

本発明は、いわゆるハイブリダイゼーション法を用いなくて特定の遺伝子の塩基配列を検出する方法に関する。より詳細には、検出すべき核酸配列に相補的な少くとも1種のプライマーを用いて、核酸配列に相補的なプライマーの伸長反応を行って得られる核酸配列、またはプライマーの伸長生成物同士で形成された二本鎖部分を有する核酸配列を、固相担体に固定化した後、検出する方法に関する。

### 先行技術

遺伝子の分子生物学の急速な進歩に伴い、特定の遺伝子の塩基配列を検出することはきわめて重要なものとなってきている。例えば、遺伝病の出生前診断、癌の分子レベルでの診断あるいはウイルスのような病原体の検出において遺伝子の検出を行うことは重大な意義がある。

このような遺伝子の検出を行うには、一般的に

はハイブリダイゼーションと呼ばれる方法が使われる(B.D. Hames および S.J. Higgins: Nucleic acid hybridization, a practical approach, IRL Press, 1985)。この方法は、標的配列と相補的な塩基配列をもつ単鎖あるいは二本鎖を放射性あるいは非放射性の標識物質で標識し、そのうち標的配列との相補性を利用して結合させて、すなわちハイブリダイズさせて、標的配列を検出する方法である。この場合、一般的には、標的物質を担体に固定するドットハイブリダイゼーション法〔DNA, 4, 327-331, (1985)〕あるいはサザンハイブリダイゼーション法〔Molecular Cloning, p382, Cold Spring Harbor (1982)〕等が行われる。しかしながら、これらの方法は煩雑で手間がかかり、機械化の努力もされているにもかかわらず、未だに多数の試料をルーチン作業として分析することは不可能である。これらの問題を解消するためにプローブを担体に固定するハイブリダイゼーション法が工夫されているが〔例えば、T.R. Gingeras ら: Nucleic Acids Res.

15, 5373-5390〕、このような液相・固相間のハイブリダイゼーションには限界があり、感度等の点で実際に応用できる方法とはなり得ていない。これらの液相・固相間のハイブリダイゼーションの欠点を克服するためにサンドイッチ型の液相・液相ハイブリダイゼーションが工夫されている〔例えば、Ann-Christine Syvaonenら: Nucleic Acids Res. 14, 5037-5048 (1986)、特開昭62-229068号公報〕。しかしながら、これらの方法も、プローブを大過剰に使う事から来る高いバックグラウンドや感度の点で、満足のいくものとはなり得ていない。

また、感度を向上させるために、特定の核酸配列を増幅する方法が開発されているが〔特開昭62-281号公報〕、この方法においてもハイブリダイゼーションの操作は必要であって、煩雑さを減じることになっていない。

〔発明の概要〕

#### 要 旨

本発明は、上記問題点を解決し、特定の塩基配

列を容易にしかも感度よく検出する方法を与えることを目的とし、検出すべき核酸配列に相補的な少なくとも1種のプライマーを用いて、該核酸配列に相補的なプライマーの伸長反応を行って得られる核酸配列、またはプライマーの伸長生成物同士で形成された、二本鎖部分を有する核酸配列を、固相担体に固定化した後、検出する方法を提供することによってこの問題を解決しようとするものである。

従って、本発明による、検体中の少なくとも一つの目的核酸の検出方法は、下記の工程(イ)～(フ)を実施すること(ただし、工程(ハ)～(ヌ)は、該目的核酸が存在するものとして実施するものとする)、を特徴とするものである。

- (イ) 少なくとも一つの目的核酸(以下、核酸(I)という)存在の有無を検知しようとする検体を用意すること。
- (ロ) 核酸(I)と相補的で、該核酸よりは短いが該核酸と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さの一本鎖核酸(以下、核酸(II))

という)を用意すること。

- (ハ) 該検体中において、核酸(I)を、これが一本鎖のものであればそのまま、これが二本鎖のものであれば一本鎖にしてからその少なくとも一方について、核酸(II)とハイブリダイズさせ、この核酸(II)をプライマーとしてそこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて、生成合成核酸鎖と核酸(I)との二本鎖核酸を形成させること。
- (ニ) 必要に応じて、該検体中において、上記二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させること。
- (ホ) 必要に応じて、核酸(I)が二本鎖のものであったときに各鎖について工程(ロ)、
- (ハ) および(ニ)を実施して得られる二種の核酸鎖を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせること。
- (ヘ) 必要に応じて、工程(イ)～(ハ)または(イ)～(ホ)を実施して得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にした後、その少

くとも一方について、核酸(Ⅱ)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(Ⅰ)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(Ⅰ)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。

(ト) 必要に応じて、該検体中において、上記二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させること。

(チ) 必要に応じて、(ヘ)を実施した後、最終的に得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にして、その少くとも一方について、核酸(Ⅱ)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこ

の二本鎖核酸の形成工程を核酸(Ⅰ)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(Ⅰ)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させることから成る工程を、1回行うかまたは複数回にわたって順次段階的に繰り返して行なうこと。

(リ) 必要に応じて、該検体中において、上記二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させること。

(ヌ) 工程(ハ)、(ホ)、(ヘ)および(チ)の産物である二本鎖核酸、工程(ニ)、(ト)および(リ)の産物である一本鎖核酸に、下記のいずれかの手段によって、固体担体と結合しうる部位からなる官能基と検出可能な標識からなる官能基とを持たせること。

(イ) 両官能基の一方をまたは双方を個々に持つプライマーまたは官能基を持たないブラ

# — 1 1 —

イマーの使用および両官能基の一方をまたは双方を個々に持つ単位核酸または官能基を持たない単位核酸の使用によって、該合成核酸鎖を両官能基を持つものとして得る。

(II) 該合成核酸鎖を一方の官能基を持つものとして形成させ、その後、そこへ、該検体中において、他方の官能基を導入する。

(ル) 工程(ヌ)の産物である両官能基を持つ核酸鎖を、該固体担体と結合しうる部位からなる官能基を利用して、該検体中において、固体担体と結合させること。

(ヲ) 工程(ル)より得られる固体担体を洗浄して、固体担体に結合していない核酸を除去すること。

(ワ) 工程(ヲ)より得られる固体担体を、該標識からなる官能基を利用する検出操作に付して、固体担体に結合している核酸の有無を、検出すべき核酸に対応するものとして検知すること。

# — 1 2 —

## 効 果

本発明による核酸配列の検出法は、前記で定義したように、ポリメラーゼなどを用いて二種類の標識物で標識された検出対象の複製物(核酸配列)を得、該標識物の一方を固相担体の固定用に、他方を検出のための標識として目的の遺伝子を検出することからなり、いわゆるハイブリダイゼーションという煩雑な操作を必要とせず、現在、他の分野例えば抗原抗体反応の分野で利用されている装置を容易に本法に応用することができる。その結果、一度に多検体を分析することができる。

そして、核酸のハイブリダイゼーションやゲル電気泳動での核酸の分離を必要としないため、核酸を含む試料は粗精製の状態でよく、試料の調製も容易で、装置を用いて行うことができる。

また、本発明ではハイブリダイゼーションを行わないでプライマーによる伸長反応を行うために、分析時間を大幅に短縮することができる。さらに、本測定法においてあらかじめ用意しておく標識物質としては、標識化プライマーあるいは標識化モ

ノスクレオチドでいずれも化学的に大量合成でき、従来のハイブリダイゼーション法のように天然のDNAフラグメントを酵素等を使って標識する必要はない。

さらに、それぞれの検出しようとする試料中において、目的核酸(I)の塩基配列が微妙に(一塩基以上)異なる場合も、ポリメラーゼ等の反応条件を適当に調節することにより、プライマーが目的核酸に完全に相補的である場合とそうでない場合を区別することができる。つまり、ハイブリダイゼーション法等によらないで容易に点突然変異をも検出することができる。

そして、それぞれ官能基の異なる標識物質で標識された複数のプライマーを使用すれば、同時に一種類以上の目的核酸(I)に対する伸長反応を行う事ができ、それぞれの標識物質の官能基を利用する検出操作を行う事によって、同時に多数の目的核酸の存在の有無を調べる事ができる。

— 15 —

非目的核酸はこれらの官能基を全く持たないかあるいは一方だけしか(たとえば、固体担体への結合部位)持たないようにしてあるから、検体を固体担体と接触させてから該固体担体を洗浄すると、担体との結合部位を持たない共存核酸は洗い流され、一方このような部位を持つ共存核酸は固体に結合しているけれどもこれは標識を持たないので、核酸結合固体について検出操作を実施しても検出されることなく目的核酸のみが検出されて、上記の選択検出が可能となる。なお、検体中に目的核酸が存在しなければ、合成核酸は生成せず、固体担体に結合する標識付き核酸も無いところから、検出結果は検体には目的核酸不在と出る。

このような選択検出性を実現すべき前記両官能基の導入は、所謂プライマー(前記の核酸(II))を使用して、たとえば目的核酸がDNAであればそれを一本鎖にしてからDNAポリメラーゼにより、目的核酸がRNAであれば逆転写酵素によって、プライマーから鎖長を伸長させ、その際に、プライマーとして両官能基のいずれをも持たない

(発明の具体的説明)

#### 検 出 原 理

本発明による少くとも一つの目的核酸の検出法は前記の工程(イ)～(フ)を含んでなるが、この方法は、(i)検体中の目的核酸(核酸(I))という)からそれと相補性の核酸を検体中でつくって(この核酸を合成核酸という)、それについて検出を行うこと、(ii)検体中の合成核酸を固体担体に固定して、合成核酸上の標識を利用して検出を行うこと、(iii)上記の(ii)を行うために合成核酸を固体担体への結合部位からなる官能基と標識からなる官能基とを導入したものとして得るが、官能基の導入を合成核酸のみが両官能基を共に持つけれども共存核酸は両官能基を共に持つことがないように行って(前記工程(ヌ))、固体担体上での検出を選択的なものとする事、を基本原理とするものである。

このように、目的核酸の塩基配列を写しとった合成核酸は、検体中においてそのみが前記両官能基を持たせてあるから、すなわち、検体中の共存

— 16 —

もの、または一方を持つもの、または双方を個々に持つもの(すなわち2種以上)を使用し、鎖長延伸の際のモノマーないし単位核酸として両官能基のいずれをも持たないもの、または一方を持つもの、または双方を個々に持つもの(すなわち2種以上)を使用して、該合成核酸鎖を両官能基を持つものとして得ること、によって行なうのが好ましい。このように得られる両官能基を持つ合成核酸鎖の具体例を挙げれば、目的核酸(I)が二本鎖DNAであるときに一方の鎖について、または一本鎖DNAであるときにはそれについて、固体担体への結合部位を持つプライマー(核酸(II))をハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸としてのdATP、dTTP、dGTP、dCTP等(詳細後記)の少なくとも一種の存在下にDNAポリメラーゼを働かせて該プライマーの鎖長を伸長させる際に、単位核酸の一個ないし一種あるいは複数個ないし複数種に標識を持たせたものを使用して原DNA鎖と合成核酸鎖との二本鎖としたもの、二本鎖DNA鎖の一方について

— 17 —

— 18 —

上記の通りに二本鎖構造体をつくり（ただし、標識を持たせた単位核酸を使用しない）、他方の DNA 鎖についても上記の通りに二本鎖構造体をつくり（ただし、プライマーとしては標識を持たせたものを使用する）、両二本鎖構造体から原 DNA 由来の鎖を除去して合成鎖を遊離させ、両合成鎖をハイブリダイズさせて、プライマーから供給された両官能基を持つ二本鎖としたもの（遊離させた各合成鎖についてプライマーの付加および（または）鎖長の伸長ないし合成鎖の形成を行って、合成鎖からなる二本鎖の増幅を行うこともできる）、その他がある。

両官能基の導入は、その他の含目的的な方法によって実施することもできる。たとえば、両官能基の一方をプライマーおよび（または）単位核酸に持たせて合成鎖を形成させ、その後、他方の官能基を導入する方法によることができる。

標識付き合成核酸は固体担体との結合部位をも持たせてある訳であるが、この場合の「固体担体との結合部位」は必ずしも固体担体と直結しうる

部位でなくともよい。すなわち、合成核酸側の該部位と固体担体側の結合部位との間に介在して両者の結合を可能ないし促進しうる物質（「捕捉用試薬」（詳細後記））を介して固体担体との結合が実現しうるようなものであってもよい。この捕捉用試薬は、合成核酸側の固体担体との結合部位にあらかじめ結合させておいてもよく、固体担体側の該結合部位に結合させておいてもよい。

また、ポリメラーゼによるプライマーの延伸反応は、別々の官能基（標識）をもつそれぞれ別々のプライマーを用いて、同一検体中複数個の目的核酸（I）に対して同時に検出を行うこともできる。

#### 検出の実際

##### a. 核 酸

本発明でいう検出すべき核酸とは、検出しようとする塩基配列を含むものであって、DNA でも RNA でもよい。このような核酸は大腸菌、ビールスおよび高等動植物などあらゆる生命体から調製することができる。また、上記核酸を、本検出

— 19 —

法に用いる場合、核酸は精製されていても、されていなくてもよい。

##### b. プライマーおよびその伸長反応

###### (i) プライマー（核酸（II））

本発明でいうプライマーは、検出しようとする上記核酸の塩基配列（DNA の場合は変性などの手段により、二本鎖核酸配列を一本鎖にする必要がある）と特異的に相補鎖を形成し、その 3' 末端にモノヌクレオチドを順次付加されるもので、3' 末端の水酸基が不可欠である。一般に、プライマーとはオリゴデオキシリボヌクレオチドのことをさすが、天然から得られる長鎖の DNA フラグメントでもよい。目的核酸（核酸（I））と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さのものであるべきである。

点突然変異を検出しようとする場合は、点突然変異を起した目的核酸と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さを有し、かつ完全に相補的なプライマー及び点突然変異を起してない該核酸と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さを有

— 20 —

し、かつ完全に相補的なプライマーの二種を用いる。これらのプライマーはいずれもオリゴデオキシリボヌクレオチドである。

この様なプライマーの具体例としては、例えば

(I) 何も修飾されてないプライマー、

(II) 固相担体と結合可能な部位を有するプライマー、

(III) 標識物質が導入されたプライマー、

(IV) 互いに異なるプライマーであって、一方が固相担体と結合可能な部位を有し、他方に標識物質が導入されたもの、

などを用いることができる。

なお、ここでいうプライマーの標識物質または固相担体と結合可能な部位は、プライマーの伸長反応を妨げない位置であればどこでもよいが、好ましくは 5' 末端である。

標識物質としては、非放射性、放射性物質のどちらを用いてもよい。

非放射性の標識物質としては、例えば後記実験例で示したビオチンのほかに、2, 4 - ジニトロ

— 21 —

— 22 —

フェニル基、フルオレセインおよびその誘導体〔フルオレセインイソチオシアネート (FITC)〕、ローダミンおよびその誘導体〔例えば、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC)、テキサスレッド等〕、4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラン (NBD-F) およびダンシルなどの蛍光物質あるいは化学発光物質などがあり、いずれも公知手段(特開昭59-93098号、特開昭59-93099号各公報参照)により、標識化を行うことができる。

また、放射性物質で標識する場合は、例えば  $^{131}\text{I}$ 、 $^{133}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{32}\text{P}$  等の放射性同位元素を用いて公知の手段により標識物質を導入することができる。

一方、固相担体と結合可能な部位は、該担体と選択的に反応可能なものであれば何んでもよい。その一例としては、上記非放射性標識物質をそのまま用いることができるが、その場合、検出に用いるべき標識物質とは、同一のものであってはいけない。好ましい一具体例としては、ビオ

チン、あるいはフルオレッセインなどの蛍光物質または2,4-ジニトロフェニル基などのハプテンをあらかじめプライマーに導入しておくことができる。なお、ここでいう固相担体は、後記に定義したものである。

プライマーのこれらによる標識化は、プライマーがオリゴデオキシリボヌクレオチドの場合、オリゴデオキシリボヌクレオチドの化学合成の後でまたは、同時に化学的に行われる(特開昭59-93098、特開昭59-93099号各公報)。

またプライマーが天然フラグメントの場合にも化学的に標識することができる(L.E. Orgel等、Nucleic Acids Res. 14, 5591-5603, (1986))。

#### (i) プライマーの伸長反応

上記、プライマーのうち、例えばIV)のプライマー(互いに異なるプライマーであって、一方が固相担体と結合可能な部位を有し、他方が標識物質が導入されたもの)を用いた伸長反応は4種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸であるデオキシアデノシン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシチミジン三リン酸およびデオキシシチジン三リン酸のうち少なくとも1種を基質としてプライマーにとりこませることにより行うことができる。

この伸長反応にはE. コーリDNAポリメラーゼI、E. コーリDNAポリメラーゼIのクレノー断片、T4 DNAポリメラーゼ、あるいは逆転写酵素が使用できる。特に、高温で伸長反応を行える耐熱酵素を用いればプライマーによる標的配列認識の特異性を高めることもできる

(F.F. Chehabら: Nature 329, 293-294 (1987))。

また、(III)のプライマー(標識物質のみが導入されたもの)を用いた伸長反応は、固相担体と結合可能な部位が導入された4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸のうち少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下、(II)のプライマー(固相担体と結合可能な部位のみが導入されたもの)を用いた伸長反応は、標識物質が導入された4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸のうち少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下、さらに(I)のプライ

マー(何も修飾されてないもの)を用いた伸長反応は、固相担体と結合可能な部位が導入された4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸のうち少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下、IV)と同様に反応を行うことにより、伸長反応の過程で、新たな標識物を発生させることができる。

なお、ここでいう標識物質または固相担体と結合可能な部位が導入された4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸は何も修飾されてない該ヌクレオチドの塩基部分に前記で定義した標識物質または固相担体と結合可能な部位が導入されたものであり、これらの化合物には種々の誘導体がある。一般に、これらの各種誘導体はプライマーに取り込まれる効率が減少する場合もあるが、無修飾化体と同様に取りこませることができる。ただし $^{32}\text{P}$ などの放射性物質で標識したデオキシリボヌクレオチド三リン酸は、非標識のものと同程度の効率でとりこまれる。代表的な非放射性標識モノヌクレオチド三リン酸としては、ビオチン化モノ



ノヌクレオチドリン酸 (P.R. Langer ら: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6633-6637 (1981)) があげられるが、そのほか蛍光物質あるいは発光物質で標識したもの、さらには 2, 4-ジニトロフェニル基のような抗体と結合するもの、でも良い。以上のような標識化モノヌクレオチドリン酸誘導体はそれぞれ伸長反応において取りこまれる効率が異なり、また伸長反応に用いる酵素との親和性も重要であり、誘導体と伸長反応に用いる酵素の組み合わせも十分に考慮しなければならない。

また、より高感度の検出が求められる時、特に検出対象の塩基配列の量が少ない時は、核酸配列の増幅法を用いることができる〔特開昭 62-281号公報〕。すなわち、上記記載の標識プライマーおよび標識モノヌクレオチド三リン酸を使えば、容易に二種類の官能基（固相担体と結合可能な部位または検出に用いる標識物質）を持たせた標的塩基配列を増幅して得ることができる。

また、プライマーの伸長反応が正しく目的の位置で始まるためには、プライマーと鋳型（すなわ

ちわち目的核酸 (I) ) との間での相補性の度合、プライマーの長さ、反応温度、などの因子を考慮しなければならない。一般に、プライマーの長さが短い場合や、相補性の度合が低い場合は、反応をより低い温度にしなければならないことはいうまでもない。

また、プライマーの伸長反応をより正しい目的の位置で行わせるためには、最初のプライマー（核酸 (II)）の伸長反応以降に、得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にした後、目的核酸 (I) の、核酸 (II) とハイブリダイズする塩基部分より 5' 側の塩基部分と相補的で、該塩基部分より短い該塩基部分と特異的にハイブリダイズするのに充分な長さの一本鎖核酸（核酸 (III)）を用いてさらに新たな伸長反応を行うこともできる（特願昭 63-149157号）。

さらに、本法を用いて点突然変異などを検出する場合は、上記に増してプライマーの伸長条件を考慮しなければならない。たとえばプライマーと目的核酸 (I) との間で形成した二本鎖（完全に

- 27 -

相補的である場合とそうでない場合) の安定性に差を出すために反応液に DMSO を加えたり、競合プライマー（目的核酸 (I) 中の点突然変異を調べる場合、正常の塩基配列に完全に相補的なプライマーと点突然変異を起した塩基配列に完全に相補的なプライマーの 2 種を混合してプライマーの伸長反応を行う。この時、目的核酸 (I) 中の塩基配列が正常であれば後者のプライマーが競合プライマーであり、逆に目的核酸 (I) 中の塩基配列に点突然変異を生じている場合は前者が競合プライマーとなる。）を加えて伸長反応を行う必要がある。

### c. 固相担体

本発明でいう固相担体は、反応に使用する溶媒およびすべての試薬に対して不活性でかつ何らかの方法で該溶液と分離できるものであれば何んでもよい。そのようなものとしては、例えば、ミクロタイターウェル、ポリスチレンボール、アガロースビーズ、ポリアクリルビーズなどを用いることができる。

- 28 -

上記固相担体は、あらかじめ前記のプライマー伸長反応により生じた二本鎖構造体（固相担体と結合可能な部位と標識物質とが導入されているもの）を捕捉するための捕捉用試薬を導入しておくことにより、固定化を容易にかつ選択的に行うことができる。

このような捕捉用試薬としては、上記の二本鎖構造体中に存在する固相担体と結合可能な部位と選択的に反応するものであればよく、好ましくは温和な条件下で反応可能なものがよい。また、両者間の結合様式としては、特異的な結合が生じるものであれば、共有結合、非共有結合を問わない。好ましくは捕捉用試薬の活性を最大限保持できる結合法が良い。これら捕捉用試薬の一具体例としては、ストレプトアビジン、抗体などが使われる。

例えば、ビオチン標識複製物を捕捉するにはストレプトアビジンを結合した担体を、フルオレッセインや 2, 4-ジニトロフェニル基の標識物に対してはそれぞれの抗体を担体上に結合したものを、用いることができる。

- 29 -

- 746 -

- 30 -

## d. 検出方法

前記記載の方法に従って調製された固相担体と上記工程(イ)～(ヌ)で調製された両官能基具備核酸とを混合して両者を結合させてから、該担体と結合しなかった目的塩基配列以外の核酸および検体に含まれる核酸以外の不純物を適当な溶媒で洗浄する。ここでいう適当な溶媒とは、核酸および標識物質などすべての試薬が安定に保たなければならないことはもちろんのこと、固相担体と合成核酸、固相担体と捕捉用試薬、捕捉用試薬と合成核酸あるいは標識と合成核酸、との結合を切りはなすような条件であってはならない。また、二本鎖部分を有する核酸配列中の両官能基が相補鎖の別々の鎖上に存在する場合は、その相補鎖が解離するような条件であってはならない。

また洗浄方法は、固定用担体の性質によって異なり、抗原・抗体反応の分野で一般的に使われている方法に従えば良い。

このような洗浄操作によって、目的の検出対象核酸(核酸(I))の複製物(合成核酸)のみを

選択的に担体に固定することができる。

次に、担体に固定された標識物質は、担体に固定したままあるいは溶液中に遊離した形で、検出することができる。遊離した形で検出するには、たとえば、標識物質と捕捉用試薬との間の結合を切りはなす、あるいは標識物質と合成核酸との間の結合を切りはなす、などの方法がある

[Herman, T.M.等、Anal. Biochemistry 156, 48-55 (1986)]。また、両官能基が合成核酸の相補鎖の別々の鎖上に存在する場合は、熱変性あるいは既知の他の方法によって二本鎖を分離し、検出用標識物質を含む鎖を溶液中に遊離させることができる。

また、二種類の異なる標識物で標識したプライマーを用いて増幅反応を行った時、その増幅配列中に制限酵素の部位が存在する場合は、担体に固定したあと、制限酵素を用いて検出用標識を含む断片を固相担体から遊離させることができる。

一方、増幅配列中に制限酵素の切断部位がない場合は検出用標識物質を含む断片を固定用担体か

- 31 -

ら遊離させることはできず、この方法を用いて増幅配列中に特定の制限酵素の切断部位が存在するかどうかを調べることができる。

標識物質の実際の検出は、使用する標識物質に応じて一般的手法を用いればよい。たとえば、標識物質がラジオアイソトープであればそのまま活性を測定すれば良いし、たとえばビオチンであればアビジン・もしくはストレプトアビジン・酵素結合体を用いて基質と反応させ、色的又は蛍光的手段により検出可能な成分を得ることができる。また、たとえば、標識物質が蛍光であれば、そのまま蛍光光度計を用いて強度を測定することができる。

さて、上記記載の方法において実際の試料を測定するには以下の点が重要である。

第一は、プライマーの伸長反応における非特異的伸長反応である。これは、プライマーが目的とした塩基配列以外のところに結合して伸長反応を起したものであるが、このような非特異的伸長反応を防止するには一般的に考察されているように、

- 32 -

プライマーのGC含量や長さを検出対象ごとに十分検討しなければならない。なお、非特異的伸長反応は反応温度を高くすることで十分解消することができ、耐熱DNAポリメラーゼ(NEB)を使用することによっても改善される。

第二番目は、未反応の標識物が担体に固定された捕捉用試薬と結合して本来の検出すべき標識化複製物(合成核酸)との反応を妨げることである。この問題を解決するためには、第一に、担体に固定された捕捉用試薬の捕捉能を大きくすることがあげられる。第二には、未反応の標識物を系外に除く事であるが、これは、標識化プライマーあるいは標識化単位核酸(モノヌクレオチド三リン酸)と検出対象となる複製物(合成核酸)の性質の差を利用して簡易ゲル濾過法等で分離することもできる[Maniatisら: Molecular Cloning p.466 (1982)]。しかしながら、それらの方法は機械化という事から考えると必ずしも好ましい方法とは言えない。そのような点から、未反応の標識物の残存量をできるだけ少なくするような反応条件を

- 33 -

-747-

- 34 -

選ぶ事が重要である。たとえば、同相担体と結合可能な部位が導入された一種のプライマーを用い、標識物質が導入された単位核酸（モノヌクレオチド三リン酸）を基質として伸長反応を行う場合には、プライマーの該部位を固相の捕捉用試薬と結合させ、モノヌクレオチド三リン酸の標識部分を検出用として検出するときにプライマーの量が担体の捕捉能を超えない程度にしなければならない。

また、標識した二種類のプライマーを用いる場合も同様で、ある程度複製物生成の効率が低下しても、プライマーの量を必要以上に使わないようにする。しかしながら、未反応の標識物の残存量を少なくするような反応条件は、捕捉用試薬が導入された担体の捕捉能が十分である場合は必要ない。

#### [実験例]

##### 実施例 1

この例は、大腸菌  $\beta$  - ガラクトシダーゼ遺伝子の検出方法を示すものである。

大腸菌 JM103（ファルマシア社）では  $\beta$  - ガラクトシダーゼ遺伝子の一部が欠失しており、

— 35 —

Tris-HCl pH8. 8、6. 7 mM  
MgCl<sub>2</sub>、6. 6 mM 硫酸アンモニウム、  
10 mM  $\beta$  - メルカプトエタノール、6. 7  
 $\mu$ M EDTA、20  $\mu$ M dATP、20  $\mu$ M  
dGTP、20  $\mu$ M TTP、1  $\mu$ M ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)  
dCTP (NEG-013H) に加えた。これを  
95℃で7分間加熱したのち、室温で5分置き、  
耐熱DNAポリタラーゼ (0. 5 U。ニューイン  
グランドバイオラブ社) を加えて50℃で10分  
間反応させた。

固定用担体であるストレプトアビジン・アガロース (BRL) は、洗浄液 (0. 01 M リン酸バッファ、pH 7. 2、0. 15 M NaCl) で二回洗浄した。次に、上記伸長反応混合物 (50  $\mu$ l) と 0. 02 M リン酸バッファ pH 7. 2、0. 3 M NaCl (50  $\mu$ l) を混合し、前処理したストレプトアビジン・アガロースに加え、室温で30分放置した。反応後、洗浄液 (200  $\mu$ l) で5回洗浄し、ストレプトアビジン・アガロースに固定された放射活性を測定した。

その部分に相当するプライマーを用いて伸長反応を行えば、欠失株（ここではJM103）と野性株（ここではHB101（BRL社））とを区別することが可能である。そこで以下に示す方法を用いて野性株と欠失株を識別する実験を行った。

大腸菌の遺伝子はRaymond L. 等の方法 [Recombinant DNA Techniques, p.45-46, Addison-Wesley Publishing Company (1983)] に従ってJM103とHB101から抽出した。プライマーの構造は以下に示すように5' 末端にビオチン (Bio) を導入したもので、自動DNA合成機NS-1 (島津) を用いてアミノ化オリゴヌクレオチドを合成し、ビオチンのコハク酸イミドエステルを用いてビオチン化した (特開昭59-93098号および特開昭59-93099号各公報)。

(Bio)-GGGTTTTTCCCACTCACGACGTTGTA

制限酵素EcoRIで消化した大腸菌DNAをポリメラーゼ反応液 [全体で50  $\mu$ l。10% DMSO、0. 05  $\mu$ g プライマー、67 mM

— 36 —

その結果、 $\beta$  - ガラクトシダーゼ遺伝子に関して野性型であるHB101と、欠失型であるJM103とを識別することができた。

##### 実施例 2

この例は、正常の $\beta$  - グロビン遺伝子と $\beta$  - グロビンの鎌状赤血球貧血対立遺伝子とを識別する方法を示すものである。

正常および鎌状赤血球貧血の $\beta$  - グロビン遺伝子は、いずれもBamHI断片をプラスミドpBR322に挿入したpBR322-H $\beta$ Ps tおよびpBR322-H $\beta$ Sを使用した [R.B. Wallaceら: DNA 3, 7-15, (1984)]。プライマーは以下に示す構造のもので、それぞれ互いに異なる鎖に相補的で、一方は、ポリヌクレオチドキナーゼ及び( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) ATPで5' 末端を標識し、他方は実施例1と同様にして合成し、ビオチン化した。

<sup>32</sup>P-5' TTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC<sup>3</sup>' - プライマーA

(Bio)-5' ACCACCAACTTCATCCACGTTCAAC<sup>3</sup>' - プライマーB

— 37 —

— 38 —

制限酵素 *EcoRI* で消化したプラスミド (pBR322-H $\beta$ Pst あるいは pBR322-H $\beta$ S) 10 ng を耐熱 DNA ポリメラーゼ反応液 (50  $\mu$ l, 10% DMSO, 0.3  $\mu$ g プライマー-A, 0.3  $\mu$ g プライマー-B, ニューイングランドバイオラ社の操作書に従って 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 6.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 6.6 mM 硫酸アンモニウム, 10 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール, 6.7  $\mu$ M EDTA, 33  $\mu$ M dATP, 33  $\mu$ M dGTP, 33  $\mu$ M dCTP, 33  $\mu$ M dTTP) に加えた。この混合液を 95℃ で 7 分間加熱し、室温にもどして 5 分間アニーリングした。つぎに、耐熱 DNA ポリメラーゼ (ニューイングランドバイオラ社) 0.5 U を加え、55℃ で 1 回目の伸長反応を 5 分間行った。以後、91℃ で 1 分の変性 + 室温で 5 分間のアニーリング + 55℃ で 5 分間の伸長反応、のサイクルを 20 回繰り返した。次に、実施例 1 と同様にして調製したストレプトアビジン-

- 39 -

放射活性の残留度は、pBR322-H $\beta$ Pst の場合 40%、pBR322-H $\beta$ S の場合 92% であって、両者を識別することができた。

### 実施例 3

この例は、一検体中の 2 種類の遺伝子を同時に検出する方法を示すものである。

目的とする遺伝子としてヒトの  $\beta$ -グロビン遺伝子とヒトパピローマウィルス 16 (HPV-16) を選んだ。 $\beta$ -グロビン遺伝子を増幅するためのプライマーとして、 $\beta$ -グロビン遺伝子の二本鎖にそれぞれ相補的でビオチン標識にした Bio-NH-CAACTTCATCCACGTTCAAC (Bio-PG1) と EITC (エオシンイソチオシアネート) で蛍光標識した EITC-NH-ACACAACGTGTTCACTAGC (EITC-PG2) を使用した。また、HPV-16 の E6 遺伝子を増幅するためのプライマーとしてビオチン標識した Bio-NH-TGAGCAATTAATGACAGC (Bio-PV01) と FITC で蛍光標識した FITC-NH-TGTGCTTTGTACGCACAAC (FITC-PV02) を使用した。また検出するサンプルとしては正常のヒトの胎盤の遺伝子および Caski

- 41 -

アガロース (50  $\mu$ l) に、上記反応混合物 (25  $\mu$ l)、水 (75  $\mu$ l) および 0.02 M リン酸バッファー pH 7.2, 0.3 M NaCl (100  $\mu$ l) を加え、室温でゆっくり混ぜながら 30 分間反応させた。洗浄液 (200  $\mu$ l) で 5 回洗浄した。つぎにストレプトアビジン・アガロースを等量ずつ二つのチューブに分けた。その一方に制限酵素 *DdeI* の反応液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 7 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール, 100  $\mu$ g/ml、子牛血清アルブミン) 100  $\mu$ l を加え、制限酵素 *DdeI* (東洋紡、10 U/ $\mu$ l) 5  $\mu$ l を加え、37℃ でゆっくりと混合しながら 5 時間反応させた。反応後、洗浄液 (200  $\mu$ l) で 5 回洗浄した。プラスミド pBR322-H $\beta$ Pst および pBR322-H $\beta$ S それぞれについて、*DdeI* 消化前および消化後の担体に残留する放射活性を測定して、*DdeI* 消化による放射活性の減少を調べた。その結果、*DdeI* 消化による

- 40 -

細胞 (ATCC: CRL1550) を使用した。前者はヒトグロビン遺伝子を持っているが、パピローマウィルスの遺伝子は存在しない。後者はヒト由来の細胞で当然、ヒトの  $\beta$ -グロビン遺伝子をもっているが、ヒトパピローマウィルス 16 の遺伝子が増幅されて存在していることも明らかにされている (The EMBO Journal 6:139-144(1987))。

反応 1: ヒトの胎盤の遺伝子 (1  $\mu$ g) とプライマー (Bio-PV01(300ng)、FITC-PV02(300ng)、Bio-PG1(300ng)、EITC-PG2(300ng) を反応液 (67 mM Tris-HCl pH 8.8, 6.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 10 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール, 6.7 mM EDTA, 200  $\mu$ M dATP, 200  $\mu$ M dGTP, 200  $\mu$ M dCTP, 200  $\mu$ M TTP, 10% DMSO) に加え (全液量: 49  $\mu$ l)、95℃ で 5 分間変性した。55℃ で 1 分間アニーリングしたのち、Taq ポリメラーゼ (NEB 社, 20/ $\mu$ l; 1  $\mu$ l) を加えて 70℃ で 2 分間伸長反応を行った。次に 92℃ で 1 分間変性し、55℃ で 1 分間アニーリングした。この変性、アニーリングおよび伸長反応を 25 回

- 42 -

繰り返した。

反応2: Caski細胞より得られたDNA (1 μg) を使用して反応1と同様のプライマーでまったく同様に伸長反応を行った。

ストレプトアビジニアガロースの調製:

ストレプトアビジニアガロース (BRL 社) は洗浄液 (10mM Tris · HCl pH 7.5, 1mM EDTA pH 8.0, 0.1M NaHClO<sub>4</sub>) で2回洗浄したのち、これにサケ遺伝子 (1 μg) を加えて前処理とした。反応液1または反応液2の20 μl を前処理したストレプトアビジニアガロース (50 μl) に加え室温で15分間放置した。これを先の洗浄液 (500 μl) で2回洗浄したのち、1M NaHClO<sub>4</sub> (500 μl) で2回洗浄した。次に、先の洗浄液 (500 μl) で2回洗浄し、10mM Tris · HCl pH 7.5, 1mM EDTA pH 8.0, 50mM NaCl (500 μl) で3回洗浄した。これに100mM NaOH (50 μl) を加えてDNA を変性して上澄を得、さらに10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA pH 8.0, 50mM NaCl 溶液 (450 μl) を加えて蛍光を測定した。FITCの蛍光測定は励起波長489 nm、

発光波長520 nmで行い、FITCに関しては励起波長520 nm、発光波長540 nmで蛍光を測定した。以下にそれぞれの蛍光強度を相対強度で示した。

	反応液1	反応液2
励起波長489 nm 発光波長520 nm	254	3360
励起波長520 nm 発光波長540 nm	1094	1381

この結果より正常のヒト胎盤DNA中にはβ-グロビン遺伝子のみが存在し、Caski細胞ではβ-グロビン遺伝子とヒトパピローマ遺伝子の両方が存在することが判定できた。

出願人代理人 佐藤 一雄

— 43 —

#### 手続補正書

平成 1 年 3 月 24 日

特許庁長官 吉田 文毅 殿

#### 1 事件の表示

昭和 63 年特許願第 231737 号

#### 2 発明の名称

検体中の目的核酸の検出法

#### 3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

湧永製薬株式会社

#### 4 代理人 (郵便番号 100)

東京都千代田区丸の内三丁目2番3号  
[電話東京 (211)2321 大代表]

6428 弁理士 佐藤 一

#### 5 補正命令の日付

発送日 昭和 63 年 12 月 10 日

#### 6 補正により する請求項の数

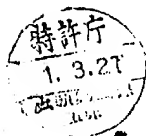
#### 7 補正の対象

明細書の「特許請求の範囲」及び「発明の詳細な説明」の欄

— 44 —

#### 8 補正の内容

- (1) 特許請求の範囲を別紙の通り補正する。
- (2) 明細書第9頁第12行の「(フ)」を「(カ)」に補正する。
- (3) 同書第9頁第13行の「(ヌ)」を「(ル)」に補正する。
- (4) 同書第10頁第14~15行の「二種の核酸鎖」を「遊離の二種の合成核酸鎖同志」に補正する。
- (5) 同書第11頁第15行~第12頁第9行の「(チ) 必要に応じて、……繰り返して行なうこと。」を、  
「(チ) 必要に応じて、(ヘ) を実施した後、最終的に得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にして、その少くとも一方について、核酸 (II) とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させることから成る工程を、1回行うか、または行った後更に同様の工程を少なくとも1回順次段階的に繰り返す。」と補正する。



返して行なうこと。」に補正する。

- (6) 同書第12頁第9行と10行の間に、  
「(リ) 必要に応じて、この二本鎖各酸の形成工程(チ)を核酸(I)の核鎖について実施して最終的に得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(I)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。」を挿入する。

- (7) 同書第12頁第10行の「(リ)」を「(ヌ)」に補正する。  
(8) 同書同頁第13行の「(ヌ) 工程(ハ)、(ホ)、(ヘ) および(チ)」を、「(ル) 工程(ハ)、(ホ)、(ヘ)、(チ) または(リ)」に補正する。  
(9) 同書同頁第14～15行の「工程(ニ)、(ト) および(リ)」を「または工程(ニ)、(ト) または(ヌ)」に補正する。

— 3 —

#### 特許請求の範囲

1. 下記の工程(イ)～(カ)を実施することを特徴とする、検体中の少くとも一つの目的核酸の検出法(ただし、工程(ハ)～(ル)は、該目的核酸が存在するものとして実施するものとする)。

- (イ) 少くとも一つの目的核酸(以下、核酸(I)という)存在の有無を検知しようとする検体を用意すること。  
(ロ) 核酸(I)と相補的で、該核酸よりは短いが該核酸と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さの一本鎖核酸(以下、核酸(II)という)を用意すること。  
(ハ) 該検体中において、核酸(I)を、これが一本鎖のものであればそのまま、これが二本鎖のものであれば一本鎖にしてからその少くとも一方について、核酸(II)とハイブリダイズさせ、この核酸(II)をプライマーとしてそこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて、生成合成核酸鎖と

- (10) 同書第13頁第8行の「(ル) 工程(ヌ)」を「(ヲ) 工程(ル)」に補正する。  
(11) 同書同頁第12行の「(ヲ) 工程(ル)」を「(ワ) 工程(ヲ)」に補正する。  
(12) 同書同頁第15行の「(ワ) 工程(ヲ)」を「(カ) 工程(ワ)」に補正する。  
(13) 同書第16頁第4行の「(イ)～(ワ)」を「(イ)～(カ)」に補正する。  
(14) 同書同頁第15行の「(ヌ)」を「(ル)」に補正する。

— 4 —

核酸(I)との二本鎖核酸を形成させること。

- (ニ) 必要に応じて、該検体中において、上記二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させること。  
(ホ) 必要に応じて、核酸(I)が二本鎖のものであったときに各鎖について工程(ロ)、(ハ) および(ニ)を実施して得られる遊離の二種の合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせること。  
(ヘ) 必要に応じて、工程(イ)～(ハ)または(イ)～(ホ)を実施して得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にした後、その少くとも一方について、核酸(II)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(I)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離さ

— 1 —

— 2 —

せた後、核酸(Ⅰ)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。

(ト) 必要に応じて、該検体中において、上記二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させること。

(チ) 必要に応じて、(ヘ)を実施した後、最終的に得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にして、その少くとも一方について、核酸(Ⅱ)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させることから成る工程を、1回行うか、または行った後更に同様の工程を少なくとも1回順次段階的に繰り返して行なうこと。

(リ) 必要に応じて、この二本鎖核酸の形成工程(チ)を核酸(Ⅰ)の各鎖について実施して最終的に得られる二本鎖核酸から該合成核酸

鎖を遊離させた後、核酸(Ⅰ)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。

(ヌ) 必要に応じて、該検体中において、上記二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させること。

(ル) 工程(ハ)、(ホ)、(ヘ)、(チ)、または(リ)の産物である二本鎖核酸、または工程(ニ)、(ト)または(ヌ)の産物である一本鎖核酸に、下記のいずれかの手段によって、固体担体と結合しうる部位からなる官能基と検出可能な標識からなる官能基とを持たせること。

(イ) 両官能基の一方をまたは双方を個々に持つプライマーまたは官能基を持たないプライマーの使用および両官能基の一方をまたは双方を個々に持つ単位核酸または官能基を持たない単位核酸の使用によって、該合成核酸鎖を両官能基を持つものとして得る。

- 3 -

(ii) 該合成核酸鎖を一方の官能基を持つものとして形成させ、その後、そこへ、該検体中において、他方の官能基を導入する。

(ヲ) 工程(ル)の産物である両官能基を持つ核酸鎖を、該固体担体と結合しうる部位からなる官能基を利用して、該検体中において、固体担体と結合させること。

(ワ) 工程(ヲ)より得られる固体担体を洗浄して、固体担体に結合していない核酸を除去すること。

(カ) 工程(ワ)より得られる固体担体を、該標識からなる官能基を利用する検出操作に付して、固体担体に結合している核酸の有無を、検出すべき核酸に対応するものとして検知すること。

- 4 -

- 5 -